

Wpływ lipopolisacharydu (LPS) na aktywność enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego erytrocytów i fagocytów karpia w badaniach *in vivo*

ANTONINA Sopińska, ANNA Grochoła

Zakład Chorób Ryb i Biologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Otrzymano 20.05.2017

Zaakceptowano 09.10.2017

Sopińska A., Grochoła A.

Effect of lipopolysaccharide (LPS) on the antioxidant enzyme system activity of erythrocytes and phagocytes of carps in *in vivo* studies

Summary

The purpose of this experiment was to estimate the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, CAT) in erythrocytes and phagocytes of carps (*Cyprinus carpio* L.) after intraperitoneal injection of LPS at a dose of 75 µg/100 g b.w. Enzyme activity was determined 3, 6 and 12 hours, as well as 3, 7, 14 and 28 days after LPS administration. After 3 and 6 hours, SOD in erythrocytes increased, respectively, to 188% and 142% of its control group level, and after 12 hours, SOD activity was significantly reduced (117%) and remained unchanged until the end of the experiment. From 12 hours after LPS administration until the end of the study, the GPx level was statistically significantly lower than in the control group, whereas the catalase activity was statistically significantly lower than in the control group in all study periods. In kidney phagocytic cells, SOD activity after 12 hours and 3 days was similar to that in the control group, and in the following study periods it amounted to 66-78% of the control values. Until the 14th day of observation, GPx activity was statistically significantly lower than it was in the control group. Catalase activity in kidney leukocytes was statistically significantly lower than in the control group during the entire experiment, and the lowest in the first study days, amounting to 48-42% of the control group value. The results indicate a long-term decrease in antioxidant enzyme activities in the experimental fish (lasting 14 or 28 days)

Keywords: antioxidant enzymes, carps, LPS, erythrocytes, phagocytes

Enzymatyczny układ antyoksydacyjny jest podstawowym mechanizmem zabezpieczającym organizmy aerobowe przed toksycznym działaniem tlenu i jego aktywnymi metabolitami (tlen singletowy 1O_2 , nadtlenek wodoru H_2O_2 , anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- i rodnik hydroksylowy.OH), wytwarzanymi podczas prawidłowo przebiegającego metabolizmu (5, 26). Głównymi enzymami tego systemu są: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) i katalaza (CAT). Działanie antyoksydantów jest wyraźnie ukierunkowane: dysmutaza ponadtlenkowa inaktywuje anion nadrtlenkowy, zapobiega reakcji powstawania rodnika hydroksylowego (z anionorodnika ponadtlenkowego i nadrtlenku wodoru) charakteryzującego się ogromną aktywnością chemiczną w stosunku do struktur biologicznych komórki, peroksydaza glutationowa i katalaza rozkładają toksyczny metabolit, jakim jest nadrtlenek wodoru, do tlenu cząsteczkowego i wody (16).

System antyoksydacyjny w komórkach zdrowych jest w stanie równowagi z poziomem wytwarzania wolnych rodników tlenowych (5). Zaburzenie fizjologicznej równowagi stwierdzone w przebiegu zaburzonego metabolizmu w następstwie działania czynników patogennych czy toksycznych prowadzi do stresu oksydacyjnego, podczas którego dochodzi w komórkach do nadmiernej kumulacji reaktywnych form tlenu RTF z jednoczesnym zahamowaniem aktywności przeciwutleniaczy (15, 20, 31, 34). Działanie czynników chorobotwórczych, ekspozycja na toksyny, immunizacja czy czynniki stresogenne mogą zwiększać stres oksydacyjny, który prowadzi do zaburzenia homeostazy, szeregu zmian biochemicznych i fizjologicznych, uszkodzeń podstawowych struktur komórkowych. W pobudzonych komórkach fagocytujących (neutrofilach, monocytach, makrofagach) zjawisko zwiększonego zużycia tlenu i obecność podwyższonej ilości aktywnych metabolitów tlenowych nazwano

„wybuchem tlenowym”, podczas którego w pierwszej kolejności wytwarzany jest rodnik ponadtlenkowy O_2^- mogący ulegać dysmutacji z wytworzeniem tlenu singletowego 1O_2 lub przekształcać się w nadtlenek wodoru H_2O_2 . Komórkami, które magazynują szczególnie duże ilości tlenu, są erytrocyty, gdyż pochodzi on nie tylko z własnych przemian, ale także jest wychwytywany ze środowiska zewnętrznego i łatwo transportowany przez kanały jonowe do wnętrza komórek. Erytrocyty charakteryzują się również wysokim stężeniem enzymów antyoksydacyjnych, które neutralizują szkodliwe działanie wolnych rodników. Aktywne metabolity tlenu generowane w leukocytach oprócz właściwości bakteriobójczych mają zdolność modulowania odpowiedzi immunologicznej jako wtórne przekaźniki wewnątrzkomórkowe. Wpływają na ekspresję genów cytokin i ich receptorów, w tym cytokin prozapalnych, białek ostrej fazy, a także enzymów przeciwutleniających (27). Reaktywne formy tlenu oprócz korzystnego działania mają też działanie negatywne, łatwo reagują w komórkach z lipidami, białkami, kwasami nukleinowymi, prowadzą do utraty selektywności błon, upośledzenia funkcji enzymatycznych białek, a także mogą być przyczyną mutacji i apoptozy komórki (2, 5, 7, 35, 38). Leukocyty i makrofagi są szczególnie podatne na zmiany wewnątrzkomórkowego statusu oksydacyjnego, pobudzenie ich do aktywności obronnej może prowadzić jednocześnie do zmian destrukcyjnych nie tylko w obrębie samych komórek uczestniczących w procesie fagocytozy, a także innych komórek układu immunologicznego. Mechanizm potęgowania reakcji adaptacyjnej układu immunologicznego przez stres oksydacyjny w przeciwieństwie do ssaków jest mało poznany u ryb. Niejednokrotnie wykazano, że eksperymentalne podanie LPS u zwierząt doświadczalnych (myszy i szczurów), a także immunizacja pstrągów przeciwko jersiniozie i wrzodzienicy indukują stres oksydacyjny (1, 3, 32, 33). Dotychczasowe badania u ryb wykazały silne działanie immunostymulujące lipopolisacharydu manifestujące się między innymi wzrostem aktywności metabolicznej komórek fagocytujących wskazujących na wystąpienie „wybuchu tlenowego” (10, 25, 28).

Wyniki te skłaniają do poznania wpływu LPS na poziom wewnątrzkomórkowego enzymatycznego układu antyoksydacyjnego chroniącego komórki ryb przed aktywnymi metabolitami tlenu.

Celem badań była ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej SOD, peroksydazy glutationowej GPx i katalazy CAT w erytrocytach krwi obwodowej i fagocytach nerek karpia (*Cyprinus carpio* L.) po podaniu lipopolisacharydu w iniekcji dootrzewnowej.

Materiał i metody

Badania wykonano w okresie wiosennym u 80 karpia o średniej masie ciała 110 ± 5 g, które na podstawie badań klinicznych uznano za zdrowe. Ryby podczas doświadcz-

nia przetrzymywano w akwariach 100 l (w zagęszczeniu 1 kg ryb/100 l wody), z wodą napowietrzaną o temperaturze $18 \pm 2^\circ C$ i codziennie karmiono karmą granulowaną. Karpi podzielono na 2 grupy: doświadczalną i kontrolną, grupie doświadczalnej podano jednorazowo, w iniekcji dootrzewnowej 100 μ l roztworu LPS w dawce 75 μ g/sztukę, grupie kontrolnej podano dootrzewnowo 100 μ l płynu fizjologicznego. LPS pozyskano ze szczepów bakterii *Aeromonas hydrophila* wg metody Boivina (6). Zastosowana dawka wykazywała w badaniach wcześniejszych wysoki efekt immunostymulujący (10). Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oznaczano w erytrocytach krwi obwodowej i fagocytach nerek. Krew pobierano z żyły ogonowej po 3, 6 i 24 godzinach oraz po 7, 14 i 28 dniach od wykonania iniekcji, każdorazowo od 6 ryb doświadczalnych i kontrolnych. Komórki fagocytarne izolowano z nerek głowowych na gradisolu (Aqua-Med., Łódź, Polska) o gęstości 1,115 g/ml (29). Izolaty komórkowe i erytrocyty zawieszano w płynie fizjologicznym i przetrzymywano w stanie zamrożenia. Stężenie hemoglobiny określano metodą Drabkina i Austina (8), zawartość białka w izolatach komórkowych oznaczono metodą opisaną przez Lowry i wsp. (19). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, EC 1.15.1.1) oznaczano w materiale biologicznym wg metody Marklunda i Marklunda (21) aktywność wyrażono w jednostkach aktywności SOD/mg białka. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx, EC 1.11.1.9) wykonano wg metody Moin (23), wykorzystując GSH jako substancję reaktywną. Aktywność peroksydazy glutationowej wyrażano jako μ mol GSH/min./mg białka. Aktywność katalazy (EC 1.11.1.6) określano wg Koroliuka i wsp. (18) na podstawie spadku stężenia H_2O_2 w próbce (tempo spadku zawartości H_2O_2 jest wprost proporcjonalne do aktywności CAT w próbce). Aktywność enzymu wyrażono jako zmniejszenie o 1 μ mol H_2O_2 /min./1 mg białka.

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Dla każdego parametru obliczano średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe. Istotność różnic pomiędzy średnimi arytmetycznymi poszczególnych parametrów w grupie doświadczalnej a grupą kontrolną określano testem t-Studenta jako statystycznie istotne ($p \leq 0,05$).

Wyniki i omówienie

Wyniki badań nad aktywnością enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, CAT) w erytrocytach karpia po stymulacji lipopolisacharydem przedstawiono w tab. 1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej SOD u ryb grupy kontrolnej wynosiła średnio $175,67 \pm 3,21$ U/mgHGB. U ryb grupy doświadczalnej po 3 i 6 godz. po podaniu LPS w iniekcji dootrzewnowej nastąpił wzrost tej wartości najwyższy po 3 godz. i wynosił, odpowiednio, $331,17 \pm 14,52$ i $249,67 \pm 24,68$ U/mgHGB, co stanowiło 188% i 142% wartości grupy kontrolnej. Uzyskane wartości były statystycznie istotne w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$). Po 12 godzinach aktywność SOD uległa znacznemu obniżeniu do 117% kontroli i na podobnym poziomie (111% do 116%) utrzymywała się do końca doświadczenia. Różnice te nie były statystycznie istotne.

Tab. 1. Poziom enzymatycznych antyoksydantów w erytrocytach krwi obwodowej karpia po podaniu LPS w iniekcji dootrzewnowej (n = 80, $\bar{x} \pm s$)

Terminy badań	Parametry		
	SOD (U/mg HGB)	PGx ($\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg HGB}$)	CAT ($\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg HGB}$)
3 h	331,17* \pm 14,52	95,48* \pm 4,60	5,50* \pm 1,05
6 h	249,67* \pm 24,68	56,43 \pm 3,80	6,23* \pm 1,41
12 h	205,57 \pm 14,35	26,17* \pm 2,87	5,17* \pm 1,47
3 dni	196,50 \pm 8,55	28,33* \pm 4,26	4,83* \pm 1,22
7 dni	197,83 \pm 10,82	23,50* \pm 2,43	9,67* \pm 1,63
14 dni	203,33 \pm 15,68	25,24* \pm 6,23	10,50* \pm 1,25
28 dni	204,17 \pm 16,82	32,44* \pm 3,06	10,67* \pm 1,63
Kontrola	175,67 \pm 3,21	46,67* \pm 4,13	18,83* \pm 1,17

Objaśnienia: * – różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

Aktywność peroksydazy glutationowej PGx w erytrocytach karpia grupy kontrolnej podczas całego doświadczenia wynosiła średnio $46,67 \pm 4,13 \mu\text{mol}/\text{minutę}/\text{mg HGB}$ (tab. 1). U ryb grupy doświadczalnej w pierwszym terminie badań nastąpił wzrost aktywności enzymu i wynosił $95,48 \pm 4,60 \mu\text{mol}/\text{minutę}/\text{mg HGB}$ (204% grupy kontrolnej), a następnie wartość ta uległa zmniejszeniu; po 6 godzinach do 122% kontroli, a po 12 godzinach do 56% wartości kontroli. Do końca doświadczenia aktywność PGx była statystycznie istotnie niższa niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$).

Aktywność katalazy CAT w erytrocytach ryb grupy kontrolnej wynosiła średnio $18,83 \pm 1,17 \mu\text{mol}/\text{mgHGB}/\text{minutę}$ (tab. 1). U ryb doświadczalnych we wszystkich okresach badania stwierdzono statystycznie istotnie niższe wartości niż w grupie kontrolnej. Najniższa aktywność wystąpiła po 3, 6 i 12 godzinach po podaniu LPS rydom i wynosiła 29%, 33% i 27% kontroli, w 28. dniu badania stwierdzono niewielki wzrost tej wartości do 56% grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki badań były statystycznie istotnie niższe niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$).

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, PGx, CAT) w fagocytach nerek karpia przedstawiono w tab. 2. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej SOD w grupie kontrolnej wynosiła $158,50 \pm 12,3 \text{ U}/\text{mg}$ białka. Uzyskane wyniki badań u ryb doświadczalnych po 3 i 6 godzinach po podaniu LPS były statystycznie istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i wynosiły, odpowiednio, $240,42 \pm 14,83$ i $186,67 \pm 11,68$ (co stanowiło 151% i 118% grupy kontrolnej). Po 12 godzinach i 3 dniach uzyskane wartości były zbliżone do grupy kontrolnej, bez statystycznie istotnych różnic. W następnych okresach badań (7, 14 i 28 dni) aktywność SOD uległa znacznemu obniżeniu, stanowiąc 66%, 73% i 78% kontroli, a uzyskane wartości były statystycznie istotnie niższe niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$).

Aktywność peroksydazy glutationowej PGx w leukocytach nerek karpia grupy kontrolnej wynosiła $25,03$

Tab. 2. Poziom enzymatycznych antyoksydantów w leukocytach nerki głowowej karpia po podaniu LPS w iniekcji dootrzewnowej (n = 80, $\bar{x} \pm s$)

Terminy badań	Parametry		
	SOD (U/mg białka)	PGx ($\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ białka)	CAT ($\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ białka)
3 h	240,42* \pm 14,83	12,14* \pm 1,36	7,22* \pm 3,10
6 h	186,67* \pm 11,68	11,36* \pm 2,40	7,58* \pm 1,60
12 h	162,12 \pm 8,47	9,16* \pm 1,28	6,28* \pm 2,40
3 dni	152,55 \pm 10,60	8,46* \pm 2,30	8,56* \pm 0,67
7 dni	105,14* \pm 9,20	5,30* \pm 1,80	8,90* \pm 0,68
14 dni	115,62* \pm 14,50	8,36* \pm 2,30	10,20* \pm 1,14
28 dni	124,37* \pm 14,20	22,40 \pm 1,60	10,50* \pm 1,86
Kontrola	158,50 \pm 13,36	25,03 \pm 2,14	15,03 \pm 4,60

Objaśnienia jak w tab. 1.

$\pm 2,14 \mu\text{mol}/\text{minutę}/\text{mg}$ białka (tab. 2). Aktywność PGx u ryb grupy doświadczalnej do 14. dnia obserwacji uległa statystycznie istotnemu obniżeniu, jedynie w 28. dniu badania uzyskane wartości nie różniły się statystycznie istotnie od grupy kontrolnej. Najniższą wartość stwierdzono w 7. dniu po podaniu LPS, która wynosiła $5,30 \pm 1,80 \mu\text{mol}/\text{minutę}/\text{mg}$ białka, co stanowiło 21% wartości grupy kontrolnej.

Aktywność katalazy CAT w leukocytach nerek grupy kontrolnej wynosiła średnio $15,03 \pm 4,60 \mu\text{mol}/\text{minutę}/\text{mg}$ białka (tab. 2). Po podaniu LPS rydom doświadczalnym już w pierwszych okresach badania po 3, 6 i 12 godzinach stwierdzono gwałtowny spadek aktywności tego enzymu, który wynosił od $7,22 \pm 3,10$ do $6,28 \pm 2,40 \mu\text{mol}/\text{minutę}/\text{mg}$ białka (od 48% do 42% grupy kontrolnej). W następnych terminach obserwacji wystąpił niewielki wzrost tej aktywności, jednak każdorazowo był on statystycznie istotnie niższy niż w grupie kontrolnej, w 28. dniu doświadczenia wynosił 70% wartości grupy kontrolnej.

Badania nad aktywnością SOD, PGx i CAT w erytrocytach i fagocytach karpia po podaniu LPS w iniekcji dootrzewnowej wskazują na istotny wpływ lipopolisacharydu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w badanych komórkach.

Dysmutaza ponadtlenkowa uważana za najważniejszy enzym antyoksydacyjny, który stanowi główną obronę przed toksycznymi skutkami działania rodnika hydroksylowego, szczególnie toksycznego metabolitu, w pierwszych godzinach po wprowadzeniu LPS do organizmu ryb, wykazała istotny wzrost aktywności, a następnie spadek do poziomu grupy kontrolnej. Znaczący wzrost aktywności po 3, 6 i 12 godzinach SOD w erytrocytach i po 3 i 6 godzinach w fagocytach może być reakcją adaptacyjną na immunizację LPS, a także wpływem LPS na ekspresję genów dysmutazy ponadtlenkowej (27). Podobny efekt zwiększonej aktywności SOD stwierdzono w tkankach ryb po podaniu szczepionek (32, 33) i po ekspozycji na ksenobiotyki (24, 34, 36). Obserwowany w badaniach późniejszych

brak reakcji ze strony SOD na podwyższony poziom metabolitów tlenowych (głównie anionorodnika ponadtlenkowego) może wynikać z gromadzenia się w komórkach dużego stężenia nadtlenu wodoru, silnego inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej. Długo utrzymujący się spadek aktywności SOD w fagocytach nerek ryb doświadczalnych, który po 7, 14 i 28 dniach wynosił od 66% do 78% aktywności enzymów w grupie kontrolnej, mógł doprowadzić oprócz zmian strukturalnych komórek, do rozwoju stanu zapalnego i zwiększonej podatności karpia na czynniki patogene. Niejednokrotnie wykazano, że eksperymentalne podanie LPS w iniekcji lub *per os* u zwierząt doświadczalnych (myszy i szczury) indukuje stres oksydacyjny i rozwój stanu zapalnego (1, 3).

W mechanizmach obronnych stresu oksydacyjnego ważną rolę odgrywają także enzymy przemian glutationowych, tj.: peroksydaza glutationowa GPx, reduktaza glutationowa GR i transferaza glutationowa (12). Peroksydaza glutationowa spełnia dwie podstawowe funkcje: redukuje nadtlenek wodoru poprzez utlenianie glutationu i obok transferazy redukuje potencjalnie aktywne hydronadtlenki lipidowe do stabilnych hydroksykwasów. Glutation utleniony dzięki reduktazie GR powraca do formy zredukowanej lub aktywnie jest usuwany z komórek (szczególnie przez erytrocyty). Sprawne usuwanie glutationu utlenionego ma znaczenie ochronne dla białek komórkowych, gdyż może on wchodzić w reakcje z grupami tiolowymi białek, zmieniając ich funkcje (5). Aktywność enzymów tej grupy była szeroko badana u ryb w doświadczeniach *in vivo* i *in vitro* (13). Obserwowany w doświadczeniu spadek aktywności GPx w erytrocytach po 12 godzinach do końca doświadczenia, a w fagocytach od początku obserwacji mógł być następstwem nadmiernego gromadzenia się H_2O_2 w komórkach i prowadzić do uszkodzenia funkcji enzymatycznych białek (17). Sagara i wsp. wskazują, że zmniejszenie systemu obronnego przeciwutleniaczy z udziałem glutationu wzmacnia stres oksydacyjny i zwiększoną cytotoksyczność RTF (26). Podobny efekt mógł nastąpić u karpia, u których aktywność GPx była znacząco zmniejszona w erytrocytach i fagocytach immunizowanych ryb LPS. Na obniżenie lub zahamowanie zdolności usuwania nadtlenu wodoru z badanych komórek wskazuje nie tylko zmniejszenie aktywności GPx, ale także zmniejszenie aktywności katalazy obserwowane podczas całego doświadczenia. W badaniach własnych aktywność CAT znacząco spadła w erytrocytach i fagocytach po 3, 6 i 12 godzinach po podaniu LPS i wynosiła od 48% do 42% wartości grupy kontrolnej. Aktywność katalazy odgrywa bardzo ważną rolę w metabolizmie erytrocytów narażonych na duże stężenie tlenu, która razem z peroksydazą i reduktazą glutationu oraz reduktazą methemoglobiny ochrania erytrocyty przez skutkami stresu oksydacyjnego (7). Wielu autorów twierdzi, że reaktywne formy tlenu wpływają na rozwój niedo-

krwistości w przebiegu nieprawidłowego metabolizmu krwinek czerwonych (5).

Wyniki badań własnych są na ogół zgodne z wynikami badań nad wpływem pestycydów na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w których wykazano obniżenie aktywności CAT w mięśniach karpia po stosowaniu diazinonu, w wątrobie, nerkach i skrzelach po ekspozycji na chlorpyrifos (24, 34).

Spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych i występowanie stresu oksydacyjnego stwierdzano nie tylko pod wpływem pestycydów, ale także metali ciężkich czy podawanych leków (4, 22, 30, 31, 35, 40, 42). Wyniki badań własnych wskazują, że w erytrocytach i fagocytach równowaga oksydoredukcyjna po podaniu LPS może nastąpić w okresie nie krótszym niż 28 dni po jego podaniu (10).

Dotychczasowy stan wiedzy potwierdza korzystny wpływ niektórych preparatów podawanych łącznie z ksenobiotykami na wzrost aktywności enzymatycznego układu antyoksydacyjnego. Wielokrotnie podkreślana jest ochronna rola propolisu podczas ekspozycji szczurów na propetamfos i karpia na chlorpyrifos oraz podczas stosowania oksytetracykliny (14, 40, 41), likopenu podczas działania chlorpyrifosu i deltametryny u karpia (34, 39), a także wyciągu z traganka u karpia poddanych toksycznemu działaniu czterochlorku węgla (13). U zwierząt doświadczalnych (u szczurów i myszy) uzyskano pozytywny efekt na markery antyoksydacyjne łącznego podawania z LPS wyciągu z asparagusa, dimetyloglicyny lub β -glukanu (1, 3, 37). W związku z powyższymi wynikami badań wskazują na potrzebę kontynuowania doświadczeń nad stosowaniem LPS u ryb z jednoczesnym poszukiwaniem skutecznych preparatów wpływających na wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych i chroniących przed niekorzystnymi skutkami stresu oksydacyjnego.

Piśmiennictwo

1. Ahmad M. P., Hussain A., Siddiqui H. H.: Effect of methanolic extract of *Asparagus racemosus* Willd. on lipopolysaccharide induced – oxidative stress in rats. Pak. J. Pharm. Sci. 2015, 28, 509-513.
2. Ahmad S.: Antioxidant Mechanisms of Enzymes and Proteins, [w:] Ahmad S. (ed.): Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman and Hall, New York 1995, 238-272.
3. Bai K., Xu W., Zhang J.: Assessment of Free Radical Scavenging Activity of Dimethylglycine Sodium Salt and Its Role in Providing Protection against Lipopolysaccharide – Induced Oxidative Stress in Mice. PLoS One 2016, 11.
4. Bairy A. C., Arisi A. C., Azzalis L. A., Simizu K., Barros S. B., Videla L. A., Junqueira V. B.: Differential effect of short-term lindane administration on parameters related to oxidative stress in rat liver and erythrocytes. J. Biochem. Toxicol. 1993, 8, 187-194.
5. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2006.
6. Boivin A., Mesrobian I., Mesrobian L.: Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens spécifique. C. R. Soc. Biol. 1933, 113, 490-492.
7. Crack P. J., Taylor J. M.: Reactive oxygen species and the modulation of stroke. Free Radic. Biol. Med. 2005, 38, 1433-1444.
8. Drabkin D. L., Austin J. H.: Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. J. Biol. Chem. 1935, 112, 51-65.
9. Gabryelak T., Klekot J.: The effect of paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. Comp. Biochem. Physiol. C. 1985, 81, 415-418.

10. Grochola A., Sopińska A., Puk K.: Wpływ immunostymulacji karpi LPS *Aeromonas hydrophila* na odporność nieswoistą i wrażliwość na zakażenie w teście challenge. *Med. Weter.* 2015, 71, 176-181.
11. Hai D. Q., Varga I. S., Matkovic B.: Effects of an organophosphate on the antioxidant systems of fish tissues. *Acta Biol. Hung.* 1995, 46, 39-50.
12. Hayes J. D., McLellan L. I.: Glutathione and glutathione dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1999, 31, 273-300.
13. Jia R., Cao L., Xu P., Jeney G.: In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidant effects of Astragalus polysaccharides against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol. Biochem.* 2012, 38, 871-881.
14. Kanbur M., Eraslan G., Silici S.: Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009, 72, 909-915.
15. Kappus H.: Oxidative stress in chemical toxicity. *Arch. Toxicol.* 1987, 60, 144-149.
16. Kohen R., Nyska A.: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 2002, 30, 620-650.
17. Kono Y., Fridovich I.: Superoxide radical inhibit catalase. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 5751-5754.
18. Koroliuk M. A., Ivanova L. I., Majorova I. G., Tokarev V. E.: A method of determining catalase activity. *Lab. Delo* 1988, 1, 16-19.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
20. Lushchak V.I.: Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 2011, 101, 13-30.
21. Marklund S., Marklund G.: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974, 47, 469-474.
22. Modesto K. A., Martinez C. B.: Effects Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 2010, 81, 781-787.
23. Moin V. M.: A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab. Delo.* 1986, 12, 724-727.
24. Oruç E. Ö., Usta D.: Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2007, 23, 48-55.
25. Saeed M. O., Plumb J. A.: Immune response of channel catfish to lipopolysaccharide and whole cell *Edwardsiella ictaluri* vaccines. *Dis. Aquat. Org.* 1986, 2, 21-25.
26. Sagara Y., Dargush R., Chambers D., Davis J., Schubert D., Maher P.: Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1998, 24, 1375-1389.
27. Skrzycki M., Czeczot H.: Ekspresja genów dysmutazy ponadtlenkowej w stanie stresu oksydacyjnego. *Post. Biol. Kom.* 2004, 31, 81-92.
28. Solem S. T., Jorgensen J. B., Robertsen B.: Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 1995, 5, 475-491.
29. Sorensen K. K., Sveinbjornsson B., Dalmo R. A., Smedsrod B., Bertheussen K.: Isolation, cultivation and characterisation of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Dis.* 1997, 20, 93-107.
30. Stara A., Machova J., Velisek J.: Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2012, 33, 334-343.
31. Stohs S. J., Bagchi D.: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 18, 321-336.
32. Tkachenko H., Grudniewska J., Pękala A., Terech-Majewska E.: Oxidative stress and antioxidant defence markers in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after vaccination against *Yersinia ruckeri*. *J. Vet. Res.* 2016, 60, 25-33.
33. Tkachenko H., Kurhaluk N., Grudniewska J., Andriichuk A.: Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis. *Fish Physiol. Biochem.* 2014, 40, 1289-1300.
34. Ural M. S.: Chlorpyrifos-induced changes in oxidant/antioxidant status and haematological parameters of *Cyprinus carpio carpio*: ameliorative effect of lycopene. *Chemosphere* 2013, 90, 2059-2064.
35. Valko M., Morris H., Cronin M. T.: Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 1161-1208.
36. Vig E., Nemcsok J.: The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.* 1989, 35, 23-25.
37. Wilczak J., Blaszczyk K., Kamola D.: The effect of low or high molecular weight oat beta-glucans on the inflammatory and oxidative stress status in the colon of rats with LPS-induced enteritis. *Food Funct.* 2015, 6, 590-603.
38. Winston G. W., Di Giulio R. T.: Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.* 1991, 19, 137-161.
39. Yonar M. E., Sakin F.: Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2011, 99, 226-231.
40. Yonar M. E., Yonar S. M., Silici S.: Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Fish Shellfish Immunol.* 2011, 31, 318-325.
41. Yonar M. E., Yonar S. M., Ural M. S., Silici S., Dusukcan M.: Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 2703-2708.
42. Zikic V., Stajin A. S., Ognjanovic B. I., Pavlovic S. Z., Saicic Z. S.: Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and transaminases in the plasma of carps (*Cyprinus carpio* L.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* 1997, 46, 391-396.

Adres autora: prof. dr hab. Antonina Sopińska, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: antonina.sopinska@up.lublin.pl